

EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS

GUÍA DE TRABAJOS DE LABORATORIO



Federico Dellagnola ^(1, 2, 3) dellagnolaf@gmail.com

Israel Vega ^(1, 2, 3) israel.vega7@gmail.com

⁽¹⁾ Instituto de Histología y Embriología (IHEM – CONICET)

⁽²⁾ Instituto de Fisiología-Facultad de Ciencias Médicas (FCM – UNCuyo)

⁽³⁾ Facultad de Cs. Exactas y Naturales (FCEN – UNCuyo)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	4
CONSIDERACIONES GENERALES.....	5
TRABAJO DE LABORATORIO I. OSMORREGULACIÓN EN EL AGUA.....	8
<i>Breve marco teórico</i>	8
Los taxa del experimento	9
<i>Objetivos</i>	11
<i>Material</i>	11
Material de laboratorio	11
Material biológico.....	11
<i>Metodología</i>	12
En peces y anfibios	12
En crustáceos.....	12
<i>Análisis de resultados</i>	12
TRABAJO DE LABORATORIO II. EXCRECIÓN Y TOXICIDAD DEL NITRÓGENO	14
<i>Breve marco teórico</i>	14
Los taxa del experimento	16
<i>Objetivos</i>	19
<i>Material</i>	19
Material de laboratorio	19
Material biológico.....	20
<i>Metodología</i>	20
<i>Análisis de resultados</i>	21
TRABAJO DE LABORATORIO III. LA HOMEOSTASIS DE LA MATERIA	22
<i>Breve marco teórico</i>	22
<i>PORTE A: LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS SALIVALES</i>	25
Objetivo	25
Material	25
Material de laboratorio	25
Material biológico.....	25
Método.....	25
Análisis de resultados	26
<i>PORTE B: UN ESTÓMAGO IN VITRO</i>	27
Objetivo	27
Material	27
Material de laboratorio	27
Material biológico.....	27
Metodología	27
Análisis de resultados	28
<i>PORTE C: DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS</i>	29
Objetivo	29
Material	29
Material de laboratorio	29
Método.....	29
Análisis de resultados	30
TRABAJO DE LABORATORIO IV. EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO	31

<i>Breve marco teórico</i>	31
<i>Objetivos</i>	34
<i>Material</i>	34
Material de laboratorio	34
Material biológico.....	34
<i>Metodología</i>	34
<i>Análisis de resultados</i>	35
TRABAJO DE LABORATORIO V. CAMBIOS ANATÓMICOS EN RESPUESTA A DESAFÍOS FISIOLÓGICOS.....	37
<i>Breve marco teórico</i>	37
<i>Objetivos</i>	40
<i>Material</i>	40
Material de laboratorio	40
Material biológico.....	40
<i>Metodología</i>	41
<i>Análisis de resultados</i>	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación y conformidad de la presión osmótica extracelular respecto al ambiente.....	9
Figura 2. Las especies animales elegidas para el experimento III: el camarón fantasma, la madrecita de agua, y la rana de uñas.....	11
Figura 3. El efecto de la ionización y temperatura en la toxicidad de $\text{NH}_4\text{-N}$	16
Figura 4. Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, el caracol manzana, y el pez dorado.	18
Figura 5. Límites máximos recomendables para una exposición aguda de amoníaco en distintos taxa de organismos acuáticos.	19
Figura 6. Ejemplo de la anatomía del sistema digestivo de un invertebrado, el caracol manzana..	23
Figura 7. El índice metabólico de los animales en función de su peso corporal y efecto de la temperatura sobre la solubilidad del oxígeno en el agua.....	32
Figura 8. La especie animal elegida para el experimento II: el pez limpiafondos.....	34
Figura 9. Mecanismos moleculares observados en las células de cloruro de peces teleósteos.	38
Figura 10. La especie animal elegida para el experimento IV: la madrecita de agua.	40
Figura 11. Histología de las laminillas branquiales de la madrecita de agua.....	41

CONSIDERACIONES GENERALES

La **fisiología** es una disciplina biológica que se ocupa del estudio de la **función** animal. La fisiología entonces intenta explicar bajo qué principios generales y leyes funcionan un organismo, y sus posibles modificaciones en respuesta al ambiente dinámico que lo rodea. Históricamente, ha sido una ciencia con una gran cuota empírica y con muchísimas aplicaciones prácticas, no sólo en el campo estrictamente biológico, sino en disciplinas médicas, veterinarias, ingenieriles y conservacionistas.

Uno de los conceptos centrales de la fisiología es el mantenimiento del medio interno en forma continua, el cual es un complejo y dinámico proceso denominado **homeostasis**. La capacidad de mantener constante el medio interno, sea extracelular o intracelular, es una propiedad fundamental de la vida y prácticamente define al término. Homeostasis no es sinónimo de equilibrio termodinámico, que en un sistema complejo como el cuerpo de un animal significa la muerte. La capacidad de mantener la homeostasis a niveles que constituyen la **norma fisiológica** (por ejemplo, un valor de concentración constante de glucosa en los líquidos extracelulares) para una determinada **variable** (en nuestro ejemplo, la glucosa) no es infinita, ni tampoco universal en todos los organismos. Consume, además, la mayoría de los recursos materiales y energéticos del que dispone un organismo en un determinado momento y lugar. Es por ello que intentaremos construir una visión fisiológica integrada abordando aspectos taxonómicos, ecológicos, evolutivos, y comparativos. Hemos seleccionado un conjunto de especies filogenéticamente distantes para evaluar sus respuestas a algunos **desafíos fisiológicos** en condiciones controladas. Como muchas experiencias **in vivo** son dificultosas o incluso controvertidas desde un punto de vista de bienestar animal, hemos desarrollado una serie de experiencias **in vitro** de modo de poner a prueba ciertas hipótesis fisiológicas aceptadas por la comunidad científica. Los trabajos prácticos son una excelente excusa para integrar el conocimiento adquirido a lo largo de estos meses, ya que “fisiología” e “integración” son dos palabras íntimamente relacionadas.

Como en la planificación de cualquier experimento, es deseable modificar una variable fisiológica por vez (y por tanto poner a prueba igual número de hipótesis de trabajo), de modo de comprender el funcionamiento de un determinado sistema u organismo. Sin embargo, y a modo de ejercicio, vamos a incluir en el análisis y conclusiones muchas más aseveraciones y posibles explicaciones fisiológicas que las que pueden ser interpretadas del experimento, de modo de integrar eficientemente los conocimientos adquiridos en la materia. Como bibliografía general,

proponemos y recomendamos la misma que durante el transcurso del curso (Brusca & Brusca, 2003; Hickman, Roberts, & Larson, 2003; Hill, Wyse, & Anderson, 2006; Randall, Burggren, French, & Eckert, 2002; Schmidt-Nielsen, 1997).

Algunas **recomendaciones** respecto a los **procedimientos experimentales** que llevaremos a cabo en Fisiología Animal:

1. Respetemos las normas de **bioseguridad** del laboratorio. El docente se encargará de proporcionar el material de protección adecuado (guantes, material descartable, etc.).
2. Si bien no vamos a trabajar con material químico/biológico peligroso, es recomendable que utilicemos ropa adecuada. Por ello, deberá traer obligatoriamente un **guardapolvo** cada vez que asista al laboratorio. También es recomendable llevar el cabello recogido y evitar dentro de lo posible el uso de objetos (como pulseras y aros) que pudiesen interferir en la manipulación de elementos, reactivos, o animales vivos.
3. Respetemos las normas de convivencia. Si ensuciamos, limpiamos. Si desordenamos, ordenamos. Colaboremos entre nosotros para que el práctico sea lo más placentero posible.
4. Tratemos de ser cuidadosos en la manipulación, tanto de sustancias irritantes como de animales vivos. Evitemos incidentes innecesarios o incómodos que nos desvíen del objetivo central del trabajo práctico.
5. Si detectamos algún síntoma comportamental extraño o claros signos de sufrimiento del animal sujeto a experimentación, avisaremos al docente responsable, quien podrá detener el experimento en caso de considerarlo necesario.
6. Tengamos bien clara la hipótesis para lo cual fue planificado el experimento. La **hipótesis** es una **afirmación** que es puesta a prueba, de modo que al concluir la etapa experimental, esta afirmación sea aceptada o rechazada.
7. Seamos críticos y minuciosos. Mantengamos a las variables que no están sometidas a prueba lo más **uniformes** posibles (controladas), de modo que nuestras conclusiones sean consistentes y sólidas.

8. Es fundamental anotar no sólo la variable que medimos, sino todo lo que “observamos” o que nos llame la atención durante el período experimental, aunque no parezca relevante. Muchas de estas observaciones pueden ayudar luego en la correcta interpretación de los resultados experimentales.
9. Identificamos cuál es el **control** del experimento. El **grupo control**, a diferencia del **grupo experimental**, es fundamental para establecer diferencias estadísticamente significativas atribuidas a la variable experimental estudiada. El control experimental puede ser **positivo** (utilizando un grupo control que sepamos de antemano responde efectivamente al diseño experimental) o **negativo** (que elimina posibles **fuentes de sesgo** o variables no puestas a prueba en nuestro diseño experimental).
10. Al concluir la experiencia, debemos definir bien qué es lo que **cuantificamos**, qué es lo que observamos, y cómo explicamos esas observaciones. Es útil plantearse interpretaciones sobre **mecanismos** fisiológicos concretos.
11. **Concluamos** sobre la hipótesis experimental. En una etapa inmediata posterior podemos discutir otros mecanismos fisiológicos y si el resultado experimental está de acuerdo con el marco teórico previo.
12. Nada mejor para fijar conocimientos, que **escribirlos**. Diseñemos un breve pero sólido informe, que resuma concisamente toda la experiencia. Tomemos de guía las preguntas que proponemos al finalizar el trabajo práctico, pero con la suficiente libertad en plantear otras preguntas, y posibles explicaciones alternativas (siempre y cuando con base fisiológica).

¡Buena suerte!

TRABAJO DE LABORATORIO I. OSMORREGULACIÓN EN EL AGUA

Breve marco teórico

El agua es la molécula cuantitativamente más importante del cuerpo de los animales, y puede representar desde un 60% del peso corporal (en un mamífero como el *Homo sapiens*) hasta un 98% en algunos animales acuáticos. El agua es el **solvente** principal del interior de las células, pero también hay un porcentaje importante formando parte de los líquidos extracelulares. Estos últimos pueden estar presentes como agua intersticial, o formando parte sustancial del plasma. En ese solvente están disueltas diversas moléculas, como proteínas, aminoácidos, glúcidos, productos nitrogenados, sistemas buffers y diversos iones inorgánicos. Esas moléculas generalmente no pueden atravesar la membrana plasmática, y por tanto participan en el fenómeno físico de **ósmosis**, que implica un movimiento del solvente (agua) a través de una **membrana semipermeable** debido a la presencia de partículas no difusibles, ejerciendo una **presión osmótica** permanente sobre la membrana. El solvente se mueve entonces desde el compartimento de menor concentración y atraviesa la membrana hacia el compartimento de mayor concentración de moléculas osmóticamente activas, hasta que la presión osmótica resultante equilibra el movimiento de agua y el flujo neto sea cero.

En los animales osmoconformadores las partículas osmóticamente activas participan de un equilibrio con lo que sucede en su ambiente (**Figura 1 A**). En otros casos, los animales regulan con precisión su **presión osmótica** (**Figura 1 B**), además de su **composición iónica**, y su **volumen plasmático extracelular**. Otras veces, los animales se comportan como reguladores en un determinado rango y como conformadores en otro rango de una misma variable (**Figura 1 C**).

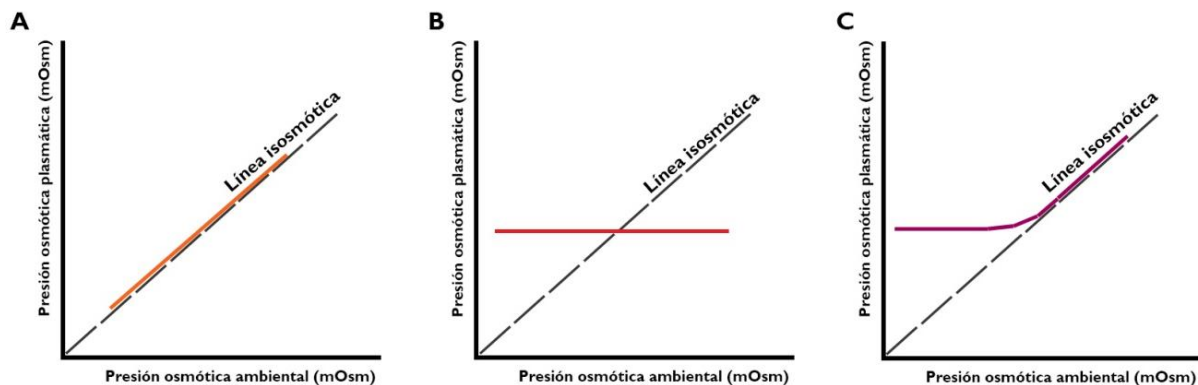


Figura 1. Regulación y conformidad de la presión osmótica extracelular respecto al ambiente.

La línea punteada de pendiente positiva corresponde a un valor osmótico teórico entre el ambiente y el plasma de un animal. **A.** La línea anaranjada representa a un animal acuático osmoconformador. **B.** La línea roja representa la presión osmótica del plasma de un animal acuático osmorregulador. **C.** La línea violeta representa a un animal que se comporta como osmorregulador a presiones osmóticas ambientales bajas mientras que es un osmoconformador a mayores presiones osmóticas ambientales.

Los crustáceos dulceacuícolas, al igual que prácticamente la mayoría de los animales que habitan en agua dulce, tienen sus líquidos extracelulares más concentrados que el medio acuoso que los rodea. Estos organismos son identificados genéricamente como reguladores hiperosmóticos ya que sus mecanismos regulatorios se pondrán en marcha para sacar agua y/o incorporar iones del medio. Por su parte, en los crustáceos marinos su medio interno es aproximadamente isosmótico con el agua de mar, y en principio habrá un equilibrio osmótico (aunque no necesariamente un equilibrio iónico).

Los peces teleósteos de agua dulce presentan características análogas a las descritas en los crustáceos de estos ambientes. Sin embargo, en ambientes marinos estos peces presentan un medio interno con una presión osmótica más baja que la presión osmótica del medio que los rodea. Esto implica que este animal tendrá a perder agua y deberá eliminar el exceso de iones en contra de un gradiente de concentración.

Los anfibios (que son generalmente animales semiacuáticos y de agua dulce,) constituyen un grupo taxonómico particular en términos de regulación osmótica, ya que están dotados de una piel fina y un riñón con un escaso desarrollo de su médula renal. Esto implica que cuando las condiciones de salinidad de su hábitat se incrementan el animal será expuesto a una situación de pérdida de líquidos corporales sin la posibilidad de regular a través de la producción de una orina concentrada.

Los taxa del experimento

En este práctico trabajaremos con ejemplares de tres especies, ubicadas filogenéticamente en los phylum **Arthropoda** y **Chordata**.

La primera especie es ***Macrobrachium borellii*** (Nobili, 1896) (**Figura 5 A**). Este camarón es uno de los crustáceos decápodos más conspicuos de la cuenca del Río de la Plata, y tiene una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana de Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil (Morrone & Lopretto, 1995). Allí vive y se alimenta dentro de la comunidad litoral béntica (Collins &

Paggi, 1997). El género *Macrobrachium* Bate, 1868 es el género más diversos de la familia **Palaemonidae** Rafinesque, 1815, una familia de camarones de distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Muchas especies son eurihalinas o capaces de soportar aguas salobres en parte de su desarrollo (Anger, 2013).

La segunda especie elegida es *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (**Figura 5 B**). Este es un pequeño pez vivíparo, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza, incluidos cuerpos de agua urbanos) gracias a su gran capacidad de resistir bajas temperaturas invernales y aguas de concentración salina elevada. Esta especie regula su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h cuando es expuesta a un incremento de la salinidad del medio (Rosso, 2006). *Jenynsia* está incluida en la familia **Anablepidae** (Garman, 1895), una pequeña taxa de peces ciprinodontiformes de origen marino, vivíparos y con un notable dimorfismo sexual; que pueden encontrarse actualmente en aguas dulces, salobres e incluso marinas (Froese & Pauly, 2015).

La tercer especie de nuestro experimento es *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) (**Figura 5 C**). Esta es una de las especies de Anuros más conocidas, originaria del África subsahariana, y un animal modelo para estudios ontogénicos y fisiológicos (Hillman, 2009). Este animal es una verdadera máquina biológica ideal para encarar experiencias fisiológicas. Por ejemplo, es capaz de cambiar el metabolismo amoniotélico a ureotélico en respuesta a la deshidratación, es resistente a condiciones anóxicas, y especialmente tiene una alta tolerancia a las soluciones hiperosmóticas (Measey et al., 2012). La rana de uñas está incluida en la familia **Pipidae**, que se caracteriza por la ausencia de lengua y un cuerpo aplanado en dirección dorsoventral, entre otros rasgos considerados ancestrales dentro del clado (Carreño & Nishikawa, 2010).

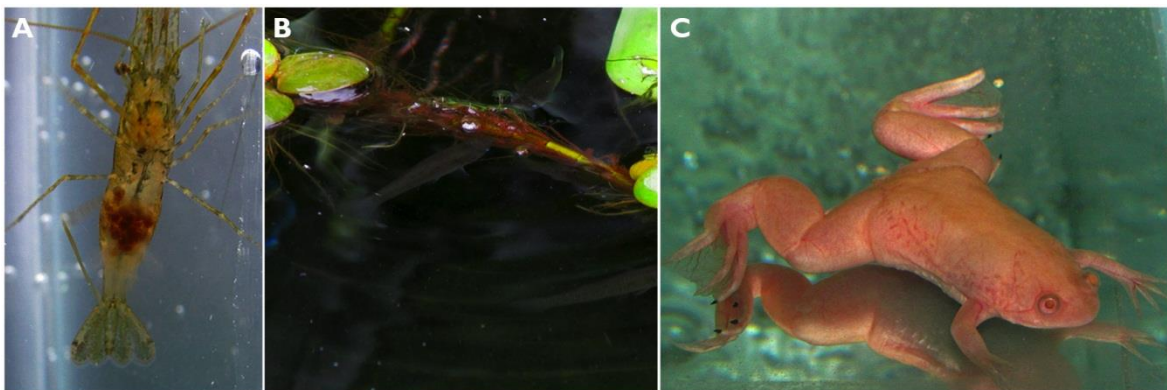


Figura 2. Las especies animales elegidas para el experimento III: el camarón fantasma, la madrecita de agua, y la rana de uñas.

A. *Macrobrachium borellii* (Palaemonidae, Crustacea). **B.** *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Osteichthyes). **C.** *Xenopus laevis* (Pipidae, Amphibia). (Fotografía A, B y C: Federico Dell'agnola).

En este experimento evaluaremos la capacidad osmorreguladora de *M. borellii*, *J. multidentata*, y *X. laevis* sometidos a medios con diferente osmolaridad (hiposmótico e hiperosmótico). Dicha evaluación se hará a través de un estudio de la ganancia o pérdida de agua en respuesta a su medio.

Objetivos

Los objetivos de esta parte son describir y entender los cambios fisiológicos que efectúan los peces teleósteos, anfibios y crustáceos cuando la concentración de su medio cambia; extrapolar los resultados a la generalidad de los organismos acuáticos, e integrar el conocimiento adquirido durante el cursado desde un punto de vista de todos los sistemas corporales.

Material

Material de laboratorio

- Recipientes contenedores para los animales.
- Balanza.
- Vasos de precipitado de 500 ml y 1000 ml.
- NaCl

Material biológico

- 3 ejemplares de *Macrobrachium borellii* (Crustacea, Decapoda).
- 3 ejemplares de *Jenynsia multidentata* (Pisces, Cyprinodontiformes).
- 1 ejemplar de *Xenopus laevis* (Amphibia, Anura).

Metodología

En peces y anfibios

1. Pesar 15 g de NaCl y disolver en 3 litros de agua destilada (Solución de agua salobre al 5%).
2. Pesar cada uno de los ejemplares y anotar su peso inicial.
3. Introducir a los ejemplares en el agua salobre durante 3 minutos (escurrir antes y después de introducirlos).
4. Pesarlos a los 3, 6, 9 y 12 minutos, revisando el estado físico de cada uno antes de la operación, y si están en malas condiciones (exceso de mucosidad, pérdida de equilibrio, respiración irregular) suspender inmediatamente el experimento. Rehidratar en agua dulce lo más pronto posible.
5. Introduzca a los ejemplares en el agua dulce, y pese a los 3, 6, 9 y 12 minutos hasta su recuperación.

En crustáceos

1. Pesar a cada uno de los ejemplares y anotar su peso inicial.
2. Introducirlos en agua salobre durante 6 minutos (escurrir antes y después de introducirlos).
3. Pesar y repita la misma operación a los 12, 18 y 24 minutos.
4. Introducir a los ejemplares en el agua dulce, y pese a los 6, 12, 18 y 24 minutos.

Análisis de resultados

1. Graficar el peso de cada ejemplar vs el tiempo de deshidratación/rehidratación para peces, anfibios y crustáceos. Identificar forma y pendientes de las curvas.

2. Elaborar un informe que resuma breve y concisamente los resultados obtenidos. Discuta y concluya sobre los mismos, tomando en cuenta las preguntas que siguen a continuación.
3. ¿Cuál es la interpretación fisiológica que usted da a las velocidades de deshidratación y rehidratación en peces teleósteos?
4. En peces y anfibios, ¿Cuál de los dos procesos (deshidratación y rehidratación) ocurre más rápido? ¿Por qué?
5. ¿Cuál es comportamiento osmótico (hídrico y electrolítico) del camarón de río, cuándo está en agua dulce y cuándo se encuentra en aguas saladas y salobres? ¿Qué pruebas obtuvo en su experimento que confirmen su respuesta?
6. ¿Qué diferencias en la cubierta corporal de los organismos observados ayuda a explicar los resultados?

TRABAJO DE LABORATORIO II. EXCRECIÓN Y TOXICIDAD DEL NITRÓGENO

Breve marco teórico

El **metabolismo** de la materia en los sistemas vivos es complejo y es una **resultante** de **procesos catabólicos** y **anabólicos**, de cuyo balance depende el mantenimiento homeostático. Como vimos al comienzo de la materia, la energía en forma de materia fluye a través de los organismos, y luego se almacena fundamentalmente bajo la forma de enlaces químicos en diferentes macromoléculas (como glucógeno, triglicéridos, creatina-fosfato o proteínas). Luego, los animales pueden utilizar esta fuente de energía a través de su catabolismo de una, obteniéndose **pequeños productos oxidados** de los cuales ya no es posible utilizar electrones para generar energía. El carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, constituyen los elementos principales de las moléculas biológicas. El catabolismo aeróbico de los glúcidos y triglicéridos tiene como productos finales proporciones diferentes de H_2O y CO_2 . El **metabolismo del nitrógeno** involucra el movimiento de grupos amino entre aminoácidos (desaminación) y otras transformaciones incluidas en ciclos metabólicos, que dan como productos finales **tres compuestos nitrogenados principales**: el **amoníaco** (NH_3), la **urea** ($CO(NH_2)_2$), y el **ácido úrico** y moléculas equivalentes ($C_5H_4N_4O_3$) (Wright, 1995). Schmitd-Nielsen (1997) postuló que el producto final del metabolismo de nitrógeno está relacionado con las características de su hábitat, la disponibilidad de agua para eliminar los diferentes catabolitos y de energía. Así, como regla general, la inmensa mayoría de los animales acuáticos son **amoniotélicos**. En el transcurso de la evolución, en el antecesor de los vertebrados, surgió la capacidad de sintetizar el compuesto urea (animales ureotélicos), que es el producto nitrogenado generado en el ciclo de la urea-ornitina. Este proceso, que implica utilización de energía ATP y pérdida de materia carbonada, está presente en los peces cartilaginosos (**Chondrichthyes**) y en los mamíferos (**Mammalia**). La capacidad de sintetizar ácido úrico como producto final nitrogenado surgió una sola vez en los vertebrados (aves y reptiles, **Sauropsida**) pero la “purinotelia” *sensu lato* es una condición común entre muchos **invertebrados**. La síntesis de ácido úrico (animales uricotélicos) es más costosa aún en materia y energía que la síntesis de urea y amoníaco, y el compuesto se forma como vía común del metabolismo de las proteínas y purinas.

¿Por qué entonces la excreción de nitrógeno se ha diversificado hacia estas tres grandes estrategias? La respuesta a esta pregunta hay que buscarla por la cantidad de agua necesaria para la excreción del producto nitrogenado final. Al parecer, el **ureotelismo** y **uricotelismo** surgió en

forma independiente como respuesta a una creciente presión de selección para conservar el agua en medios donde ésta es un bien escaso, ya que la urea y (especialmente) el ácido úrico, necesitan muy poca agua para su excreción cuando la comparamos con el amoníaco. Éste último compuesto es muy soluble en agua (y por tanto, dentro de las células) por lo que es necesario una gran cantidad de “agua externa” para disolver este amoníaco intracelular. Por otro lado, la pérdida extra de materia y energía necesaria para la **síntesis de urea y ácido úrico** puede verse compensada no sólo por el ahorro de agua, sino por la **pérdida de toxicidad** respecto al **amoníaco**. El amoníaco es una molécula pequeña, polar pero no ionizada, capaz de atravesar las membranas celulares. Se comporta además como una base, por lo que puede cambiar el pH intracelular y en consecuencia alterar el funcionamiento y estructura de las enzimas y proteínas internas.

El amoníaco o **amonio libre** (NH_3) está en equilibrio con la forma ionizada del compuesto, el **ión amonio** (NH_4^+) (**Figura 7A**). Como el metabolismo general del organismo es ácido, una parte de este amoníaco se excreta como sales de amonio vía renal o branquio/tegumental. El amonio es un compuesto que no puede atravesar las membranas por su carga eléctrica y por lo tanto es menos tóxico que el amoníaco. A nivel ecosistémico, el amoníaco es fundamental como macronutriente para las proteínas de los seres fotosintéticos (plantas y algas). También puede ser utilizado como fuente de electrones por algunas bacterias, que transforman secuencialmente el amoníaco/amonio en **nitritos** (NO_2^-) y **nitratos** (NO_3^-), los cuales pueden ser también incorporados por los organismos fotosintéticos para la biosíntesis de moléculas nitrogenadas. Estas características químico-ecológicas hacen que el amonio/amoníaco disuelto en el agua sea escaso en cuerpos de agua **oligotróficos**. En ciertas condiciones, como ambientes muy **eutrofizados** o con una carga orgánica importante, exista una mayor concentración de amoníaco en el agua. En esta situación, que es extremadamente común en condiciones de cultivo de organismos acuáticos extensivos que no tienen una carga bacteriana nitrificante suficiente, puede acumularse amoníaco (Francis-Floyd, Watson, Petty, & Pouder, 2010). Según la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) un valor de 17 mg/l de nitrógeno-amoníaco total es el límite máximo de concentración tolerable para una exposición aguda de una hora promedio para la vida acuática (a pH 7 y 20 °C) (EPA, 2013), aunque la toxicidad del compuesto está en función del pH y de la temperatura del medio (**Figura 7B**).

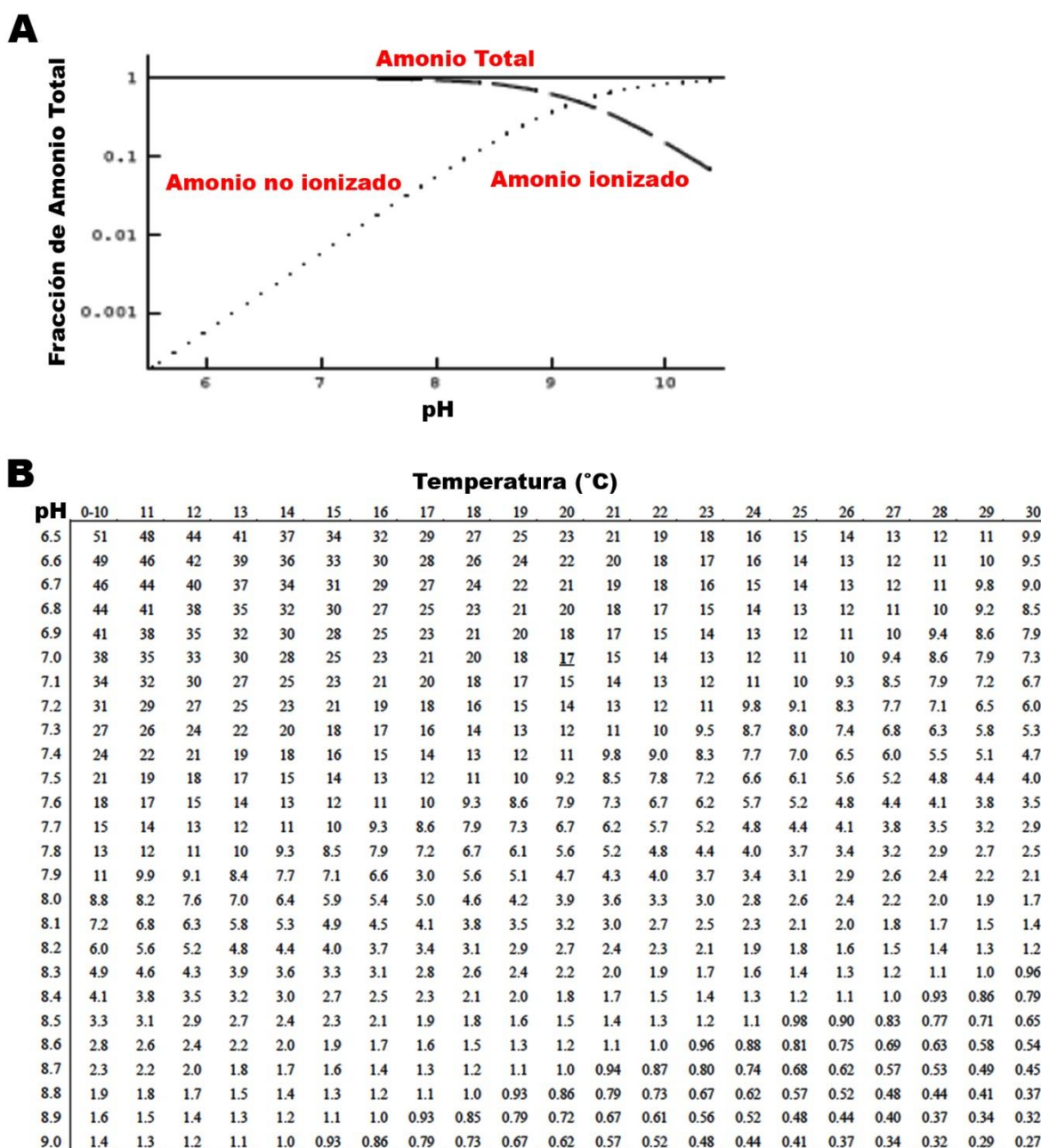


Figura 3. El efecto de la ionización y temperatura en la toxicidad de $\text{NH}_4\text{-N}$.

A. Fracción de Amonio ionizado y no-ionizado en función del pH. **B)** Valor máximo aceptado para la vida acuática en agua dulce de Nitrógeno-Amoníaco total en función del pH y la temperatura. Los valores están expresados como Nitrógeno-Amonio Total (NAT) en mg/l. Modificado de EPA (2013)

Los taxa del experimento

En esta experiencia vamos a estudiar el posible efecto tóxico que tiene una solución de sales de amonio sobre tres taxa de animales acuáticos distanciados filogenéticamente; un **crustáceo**,

Macrobrachium borellii (Palaemonidae, Decapoda); un **molusco**, *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae, Gastropoda) y un **pez óseo**, *Carassius auratus* (Cyprinidae, Cypriniformes) (**Figura 8**).

En primer lugar, hemos elegido al camarón ***Macrobrachium borellii*** (Nobili, 1896) (**Figura 8 A**). Este camarón es uno de los crustáceos decápodos más conspicuos de la cuenca del Río de la Plata, y tiene una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil (Morrone & Lopretto, 1995), que vive y se alimenta en la comunidad litoral béntica (Collins & Paggi, 1997). El género *Macrobrachium* Bate, 1868 es el género más diversos de la familia Palaemonidae Rafinesque, 1815, una familia de camarones de distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Los crustáceos decápodos son animales completamente amoniotélicos.

En segundo lugar, vamos a trabajar con el gasterópodo dulceacuícola ***Pomacea canaliculata*** (Lamarck, 1822) (**Figura 8 B**). Este caracol es notable desde todo punto de vista. Es nativo de la cuenca del Río de la Plata y es por lejos la especie mejor estudiada y conocida por su enorme capacidad invasora (Hayes, Joshi, Thiengo, & Cowie, 2008; Joshi & Sebastian, 2006; Lowe, Browne, Boudjelas, & De Poorter, 2000; Rawlings, Hayes, Cowie, & Collins, 2007). La especie ha expandido en el país su área de distribución original, colonizando otros ambientes del oeste y sur del país. Si bien este animal es un respirador dual, vive en el agua y como tal, es amoniotélico. Sin embargo, se ha descrito que acumulan ácido úrico concentrado en cuerpos cristaloides alojados en un tejido perivascular, con una posible función antioxidante durante el periodo de estivación (Vega, Giraud-Billoud, Koch, Gamarra-Luques, & Castro-Vazquez, 2007). *Pomacea canaliculata* pertenece a la familia **Ampullariidae** Gray, 1824 incluye moluscos de agua dulce y está representada por 9 géneros y más de 150 especies. Están distribuidos en zonas tropicales, en cuerpos de agua lóticos y lénticos de África, Asia y Sudamérica.

Por último, vamos a mencionar al pez dorado, una especie muy apreciado en acuarismo. ***Carassius auratus*** (Linnaeus, 1758) (**Figura 8 C**) es un pez exótico, de los cuales existen numerosas formas obtenidas por selección artificial. La especie es resistente, y suele vivir en el bentos de ambientes lóticos, a veces eutróficos, ricos en vegetación (Froese & Pauly, 2015). *Carassius* es un pez teleosteo, taxón que excreta la mayor parte del nitrógeno residual bajo la forma de amoniaco a nivel del epitelio branquial, el cual es el órgano excretor de nitrógeno por excelencia (Evans, Piermarini, & Choe, 2005). La familia **Cyprinidae** Rafinesque, 1815 es una de las más ricas a nivel específico dentro de los peces, y son todos animales de distribución en América del Norte, África, y

Eurasia (Froese & Pauly, 2015). Algunos miembros han desarrollado una capacidad invasora asombrosa, y pueden encontrarse en todo el mundo, como por ejemplo la carpa común (*Cyprinus carpio*), la cual es considerada una de las 100 peores especies invasoras del mundo (Lowe et al., 2000).



Figura 4. Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, el caracol manzana, y el pez dorado.

A. *Macrobathium borellii* (Palaemonidae, Crustacea). **B.** *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae, Gastropoda). **C.** *Carassius auratus* (Cyprinidae, Osteichthyes). (Fotografía A, B, y C: Federico Dell'agnola).

Los valores de toxicidad aguda difieren entre los distintos taxa, siendo los peces y los moluscos más resistentes que los invertebrados bentónicos (**Figura 9**). Los signos característicos de toxicidad aguda por amoníaco son inmovilidad, pérdida del equilibrio, y mortalidad (EPA, 2013). En los animales donde esto puede evaluarse, la toxicidad por amonio no ionizado puede también evaluarse por un incremento en la ventilación branquial, ya que el amoníaco daña el epitelio branquial (Lang, Peters, Hoffmann, & Meyer, 1987), causa acidosis metabólica (Russo, 1985) desacopla la fosforilación oxidativa en el cerebro (Camargo & Alonso, 2006) y afecta la actividad osmorreguladora y circulatoria (Arillo, Margiocco, Melodia, Mensi, & Schenone, 1981; Tomasso, Goudie, Simco, & Davis, 1980).

Taxa (agua dulce)	Exposición aguda (mg NAT/l)	Exposición crónica (mg NAT/l)
<i>Peces óseos</i>	4-33	1-7
<i>Crustáceos bentónicos</i>	6-8	2-3
<i>Otros invertebrados (anélidos, moluscos, etc.)</i>	17-23	4-5

Figura 5. Límites máximos recomendables para una exposición aguda de amoníaco en distintos taxa de organismos acuáticos.

La tabla muestra rango valores máximos promedio de concentración tolerable en exposiciones de una hora de duración, recomendables por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos para exposiciones agudas y crónicas en diferentes taxa (géneros y especies) de agua dulce. Los valores están expresados como Nitrógeno-Amonio total (NAT) en mg/l. Modificado de EPA (2013)

Objetivos

Evaluar cualitativamente el efecto que tiene el amoníaco sobre diferentes especies de animales acuáticos. Este experimento nos dará pie para repasar la excreción del nitrógeno en los animales y las ventajas/desventajas fisiológicas de cada molécula nitrogenada como producto de excreción en los animales.

Material

Material de laboratorio

- Tres peceras de vidrio con su correspondiente termómetro.
- Aireador y piedra difusora, con sus correspondientes reguladores.
- Agua destilada.
- Ácido clorhídrico

- Hidróxido de sodio
- PHímetro.
- Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), solución 1M.

Material biológico

- 3 ejemplares del pez *Carassius auratus*.
- 3 ejemplares del camarón *Macrobrachium borellii*.
- 3 ejemplares del caracol *Pomacea canaliculata*.

Metodología

1. Dividir a los animales en los tres acuarios, procurando ubicar un ejemplar de cada especie por acuario.
2. Calcular la concentración necesaria de sulfato de amonio necesaria para obtener valores de amonio total de aproximadamente 1, 5, y 10 mg/l de Nitrógeno-Amonio total (NAT).
3. Llenar las peceras con agua declorada. Conectar aireación suave.
4. Con cuidado, modificar el pH del acuario 2 hacia el valor 6.5 (agregando HCl). Hacer lo mismo en el acuario 3, de forma de llevar el pH hacia el valor 8.0 (con el agregado de NaOH).
5. Una vez estabilizado el pH, introducir los animales en los acuarios procurando el menor stress posible. Esperar 10 minutos a que los animales estabilicen su ritmo respiratorio.
6. Agregar a cada acuario la cantidad suficiente de sulfato de amonio, de modo de llegar a una concentración final de 1 mg NAT/l. En los siguientes 15 minutos, anotar y registrar el ritmo respiratorio (en base a los movimientos operculares) del pez, y el comportamiento del camarón y del caracol.

7. Posteriormente, elevar la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta 5 mg NAT/l. Proceder como en el caso anterior. Suspender el experimento en el caso de registrar un comportamiento franco de intoxicación en los animales.
8. Luego de 15 minutos, elevar la concentración de NH_4Cl hasta 10 mg NAT/l. Proceder como en el caso anterior. Suspender el experimento en el caso de registrar un comportamiento franco de intoxicación en los animales.

Análisis de resultados

1. Graficar ritmo respiratorio de *Carassius auratus* (en una unidad apropiada) vs concentración de amonio (NAT). Graficar también el ritmo respiratorio de *Carassius auratus* en función del pH a una misma concentración de amonio. Identificar forma y pendientes de las curvas.
2. Discutir el comportamiento de los invertebrados en función de la concentración de amonio total y el pH.
3. Elaborar un informe que resuma breve y concisamente los resultados obtenidos. Discuta y concluya sobre los mismos, tomando en cuenta las preguntas e interrogantes posteriores.
4. ¿A qué se atribuye el efecto tóxico del amonio libre? Correlacione la forma, solubilidad y tamaño de la molécula con sus efectos celulares.
5. ¿Cómo relaciona el cambio comportamental en los invertebrados y la concentración de amonio libre?
6. ¿Cómo influiría la temperatura sobre el efecto tóxico del amonio libre un organismo animal?
¿Cuál es la explicación fisiológica?
7. ¿Son los resultados obtenidos consecuentes con el marco teórico aprendido durante el curso de la materia?

TRABAJO DE LABORATORIO III. LA HOMEOSTASIS DE LA MATERIA

Breve marco teórico

Los mecanismos fisiológicos que mantienen el medio interno constante funcionan en condiciones normales por múltiples bucles autorregulatorios. Sin embargo, estos mecanismos de retroalimentación no son cerrados sino que necesitan de un flujo de energía y recambio de materia. La entrada de materia nueva involucra el ingreso, vía **ingestión** de **alimentos**, de los nutrientes necesarios para mantener la homeostasis y estructura corporal: hablamos de **proteínas**, **carbohidratos**, **lípidos**, **vitaminas**, y **minerales**.

Los animales han desarrollado diferentes estrategias de alimentación a lo largo de la evolución. Por ejemplo, muchos animales acuáticos se alimentan **filtrando** al alimento de la columna del agua por estructuras especializadas. Otros establecen **asociaciones simbióticas** con otros organismos, quienes son los encargados de sintetizar los compuestos necesarios para el funcionamiento del huésped. Sin embargo, la mayoría de los animales se alimentan de otros organismos sobre los que predan, y posteriormente, **digieren** en el **tubo digestivo**, y posteriormente **absorben** a medida que los componentes esenciales de los alimentos llegan al intestino.

La digestión es el proceso de transformación de los alimentos, previamente ingeridos, en sustancias más sencillas para ser absorbidos, ya que en términos generales la mucosa gastrointestinal no puede hacerlo cuando los alimentos están en su forma natural. El sistema digestivo es un tubo abierto, generalmente de un solo sentido, que cuenta con órganos y varias glándulas accesorias como las glándulas salivares, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas de los vertebrados, o la glándula digestiva (“hepatopáncreas”), glándulas salivares o glándulas unicelulares en los invertebrados (**Figura I.1**).

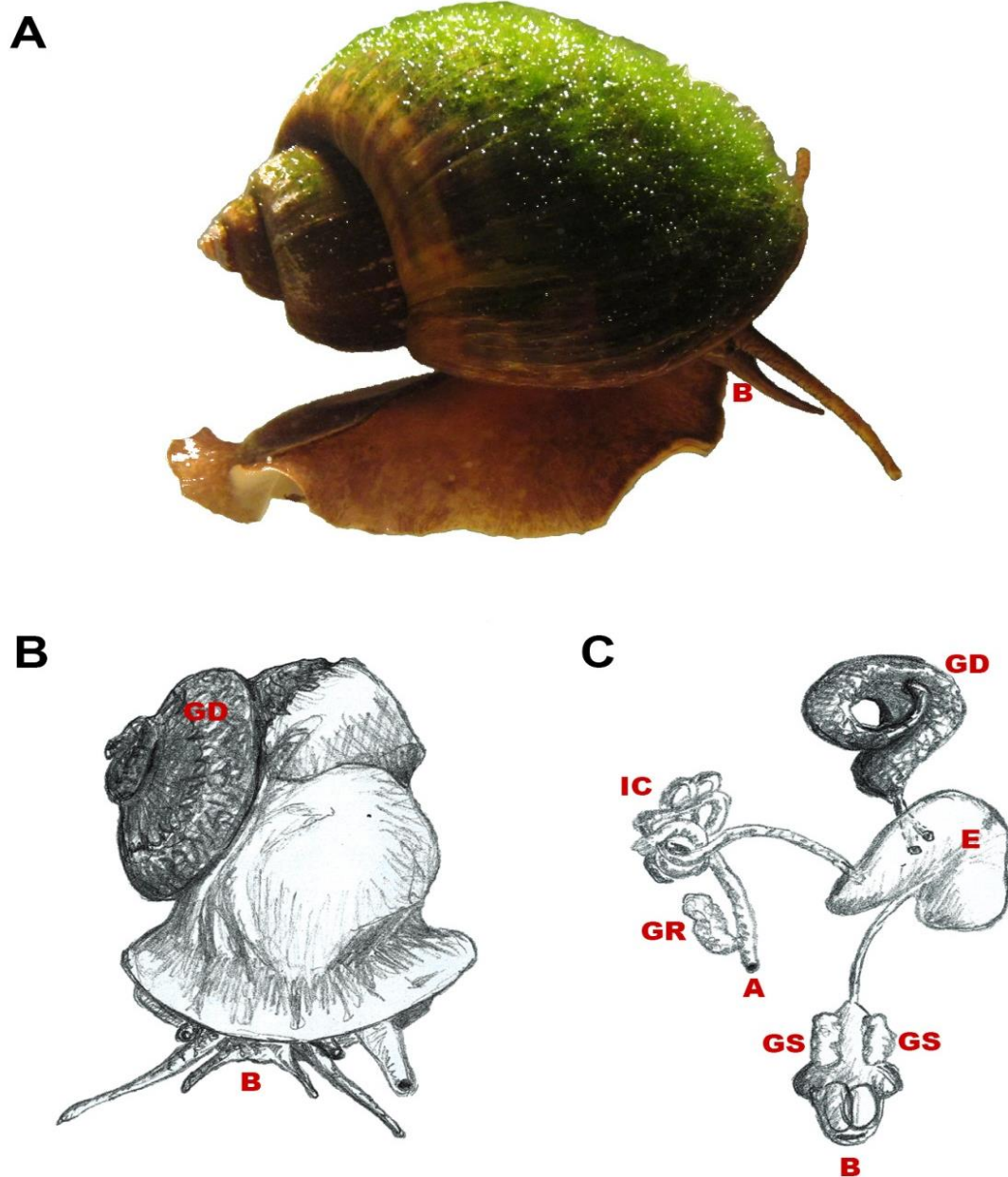


Figura 6. Ejemplo de la anatomía del sistema digestivo de un invertebrado, el caracol manzana.

A. Aspecto externo *in vivo* de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Ampullariidae, Gastropoda). **B.** Ilustración que muestra la topografía de los órganos internos del molusco, luego de retirar su concha. **C.** Esquema simplificado del tubo digestivo. En letras rojas, se indican órganos y estructuras anatómicas. B: boca. GD: glándula digestiva. GS: glándula salival. E: estómago. IC: intestino contorneado. GR: glándula rectal. A: ano. Modificado de Dellagnola (2015).

La fisiología de la digestión puede dividirse en dos etapas; una etapa mecánica (o masticación) y una etapa química (por medio de enzimas que degradan el alimento en sus

compuestos más simples). Como ocurre en la mayoría de los mecanismos fisiológicos que estudiaremos, esta división es sólo a los fines didácticos y de facilitar nuestra comprensión de lo observado. La realidad indica que ambas etapas comienzan ya en la boca. En los vertebrados, por la masticación se corta, muele y tritura la comida sólida; facilitando de esta forma la deglución y ampliando la superficie del bolo alimenticio para la acción de las enzimas digestivas. Al mismo tiempo, las glándulas salivales secretan, entre otros compuestos, **enzimas amilasas**. Las amilasas pueden desdoblar los azúcares complejos que forman el almidón en azúcares simples. Posteriormente, este bolo alimenticio pasa hacia el esófago, por el cual ingresa finalmente a un ensanchamiento del tubo digestivo denominado estómago. En el estómago se secretan varias sustancias, pero sólo dos hemos de destacar: el **ácido clorhídrico** sintetizado por las **células oxínticas**, y el **pesinógeno** (cimógeno) **sintetizado por las células principales**. El pepsinógeno se convierte en pepsina en medio ácido. Tanto el ácido como la enzima pepsina son capaces de convertir el sustrato proteico del alimento en pequeños polipéptidos.

El páncreas y el hígado en conjunto aportan al intestino delgado, lugar donde comienza la última etapa de **digestión extracelular**, una gran cantidad de sales biliares, bicarbonato, y enzimas lipasas que se encargan, por una parte, de neutralizar el ambiente ácido del alimento que proviene del estómago, y por otro lado, de emulsionar las grasas para su descomposición enzimática posterior. Entre otras enzimas, se destaca la **tripsina**, que también se secreta como cimógeno pero se activa en el intestino siendo su actividad óptima a pH alcalino. Esta enzima rompe los aminoácidos de cadena corta formados en la luz estomacal. De ésta forma, las proteínas liberan a los aminoácidos componentes de su estructura primaria, que continúan su flujo unidireccional, junto con los demás componentes esenciales del alimento, hacia el intestino medio, donde serán absorbidos por las microvellosidades intestinales y de allí pasa a la linfa, la cual es conducida hacia el sistema venoso y de allí conducido al hígado, órgano regulador del metabolismo energético por excelencia.

PARTE A: LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS SALIVALES

Objetivo

Investigar in vitro la presencia de amilasa de origen salival y su pH adecuado para su funcionamiento

Material

Material de laboratorio

- Vaso de precipitado (2)
- Varilla de vidrio (4)
- Tubos de ensayo (4)
- Lugol (solución de I_2/KI)
- Solución amortiguadora de fosfatos (PB) pH 7.4
- Solución de ácido clorhídrico 0.1N
- Pipeta Pasteur (2)
- Agua destilada

Material biológico

- Saliva
- Fécula de maíz ($\frac{1}{2}$ cucharada)

Método

- 1- Preparar una solución de almidón, agregando en el vaso de precipitado con agua y fécula. Agitar bien.
- 2- Agregar a cada tubo un volumen igual de solución almidonada (unos 2 ml).
- 3- Colectar en un vaso de precipitado unos 5 ml de saliva.
- 4- Agregar 5 ml de PB en el tubo 1,2, y 3. En el Tubo 4 agregar 5 ml. de ácido clorhídrico 0.1 N.

- 5- Agregar 1 ml de agua destilada en el tubo 1, 0.5 ml de saliva en el tubo 2, y 1 ml. de saliva en el tubo 3, y 4.
- 6- Con la pipeta Pasteur, agregar la saliva a uno de los tubos de ensayos con el almidón. Mezclar bien.
- 7- Agregar dos gotas de Lugol a cada tubo. Mezclar bien.
- 8- Registrar las observaciones e interpretar los resultados.

Análisis de resultados

1. Completar la siguiente tabla con los resultados obtenidos:

Tubo	1	2	3	4
Solución de almidón (ml)	2	2	2	2
PBS (ml)	1	1	1	-
HCl 0.1 N (ml)	-	-	-	1
Saliva (ml)	-	0.5	1	1
H₂O (ml)	1	-	-	-
Lugol (gotas)	2	2	2	2
Color (t=0)				
Color (t= 5 min)				
Color (t=15 min)				

2. Identificar el control y los tratamientos del experimento. Registrar el color de la solución de lugol en los diferentes tratamientos y a los diferentes tiempos. Explicar los resultados de cada uno.

PARTE B: UN ESTÓMAGO *IN VITRO*

Objetivo

Evaluar el efecto del pH estomacal sobre un alimento rico en proteínas y su relación con la masticación.

Material

Material de laboratorio

- Ácido clorhídrico 0.1 N
- Frascos de vidrio (4)
- Probeta graduada (1)
- Bisturí (1)
- Pinza (1)
- Agua destilada
- Cubetas de cuarzo para espectrofotometría (2)

Material biológico

- Trozos pequeños de carne, de aproximadamente el mismo tamaño (4)

Metodología

- 1- Agregar en el primer frasco 5 ml de agua destilada, en el segundo 2.5 ml de agua y 2.5 ml de solución de ácido clorhídrico; y en el tercer y cuarto frasco agregar 5 ml de solución de ácido.
- 2- Colocar, en cada uno de los tres primeros frascos, un trozo de carne a la que previamente se la picó con el bisturí. En el cuarto frasco coloque un trozo entero de carne sin picar. Esperar durante 15 minutos, agitar intermitentemente.
- 3- Con una pinza comparara la textura y el “alimento” extraído de cada uno de los frascos.

- 4- Tomar 100 µl de la solución de cada frasco y diluir en 900 µl de agua destilada. Cuantificar la absorción en el espectrofotómetro a 280 nm. Restar la absorbancia del blanco (1 ml de agua destilada para el tratamiento 1 y 100 µl de solución de HCl 0.1 N diluidos en 900 µl de agua destilada para el tratamiento 2, 3 y 4) a la misma longitud de onda. Anotar los resultados en la tabla adjunta.

Análisis de resultados

1. Completar la siguiente tabla con los resultados obtenidos:

Frasco	1	2	3	4
Carne	Picada	picada	picada	entera
H ₂ O (ml)	5	2.5	-	-
HCl 0.1N (ml)	-	2.5	5	5
Textura				
Turbidez				
Absorbancia (280 nm)				

2. ¿En qué frasco la carne cambió más de textura? ¿Por qué?
3. ¿Porque es posible comparar este proceso químico *in vitro* con la digestión?
4. ¿Qué diferencias encuentra con el proceso que ocurre en el estómago?
5. ¿Qué diferencia se encontró entre la carne picada y la carne entera?
6. Si observó diferencias en la absorbancia, ¿A qué se atribuye?

PARTE C: DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivo

Evaluar la hidrólisis enzimática de proteínas.

Material

Material de laboratorio

Ácido clorhídrico (1 N).

Tripsina (solución stock 5mg/ml)

Gelatina (solución al 2 %)

Microtubos Eppendorf de 1.5 ml (4)

Micropipetas automáticas

Método

- 1- Colocar en 4 microtubos eppendorf (1.5 ml) 700 µl de una preparación de gelatina al 2%.
- 2- Posterior a la solidificación adicionar 0.5 ml de solución preparada según la tabla adjunta:

Tubo	1	2	3	4
Gelatina 2% (µl)	700	700	700	700
HCl 0.1 N (µl)	-	-	-	450
Tripsina 5mg/ml (µl)	-	10	50	50
H ₂ O (µl)	500	490	450	-

- 3- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 4- Registrar e interpretar los resultados.

Análisis de resultados

1. Identificar el control y los tratamientos del experimento. Registrar el efecto de las soluciones sobre la gelatina. Explicar los resultados.

TRABAJO DE LABORATORIO IV. EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO

Breve marco teórico

La **temperatura** es posiblemente el parámetro físico que más influye en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos. Este parámetro es una medida de una de las formas de energía de la materia, el **calor**. Sin embargo, el calor, a diferencia de la **energía química, eléctrica, y mecánica**, es una forma de **energía** que no realiza ningún tipo de trabajo en los organismos vivos. ¿Por qué entonces es tan importante en el estudio de la fisiología? Por una razón fundamental: los efectos *indirectos* de la temperatura afectan al metabolismo, **aumentando** la **velocidad** de las reacciones químicas al aumentar la temperatura, y **disminuyendo** la **solubilidad** de los gases en medio acuoso.

Uno de los parámetros más significativos para estudiar la velocidad de consumo de energía en un organismo es el **índice metabólico**. Este parámetro expresa la cantidad de energía necesaria que necesita un animal para mantener el cuerpo en funcionamiento por unidad de tiempo. El índice metabólico puede medirse directamente por calorimetría, o indirectamente por la medición del consumo de oxígeno de un animal. Diversas variables pueden alterar el índice metabólico de un organismo, por ejemplo, el ejercicio y el consumo de alimentos. Por eso los indicadores utilizados tienen que estar estandarizados, manteniendo a los animales en ayuno y en reposo al realizar la experiencia. En estas condiciones controladas, es posible definir entonces un valor medio de **índice metabólico basal** (en animales homeotermos) o un **índice metabólico estándar** (en animales poiquilotermos). Es importante destacar que en los animales que no regulan su temperatura existen tantos IBE como temperaturas posibles.

Además, el índice metabólico es una función alométrica respecto al peso corporal y no directa (**Figura II.1 A**). Esto conduce al concepto de **índice metabólico específico** para el **peso**. De esta curva puede deducirse que los animales pequeños tienen un **índice metabólico específico** más elevado en función del **peso** que los animales grandes. Existen numerosas explicaciones a éste fenómeno, aunque la más extendida es la que plantea una mayor relación superficie-volumen en los animales pequeños, y en consecuencia una mayor velocidad de pérdida de calor hacia el medio externo.

Por otra parte, la **solubilidad** del **oxígeno** (en condiciones de saturación) **disminuye** drásticamente al **aumentar** la **temperatura** del agua, a salinidad y presión equivalentes (**Figura II.1**

B). En pocas palabras, las aguas frías tienen una mayor capacidad de contener oxígeno que las aguas más cálidas.

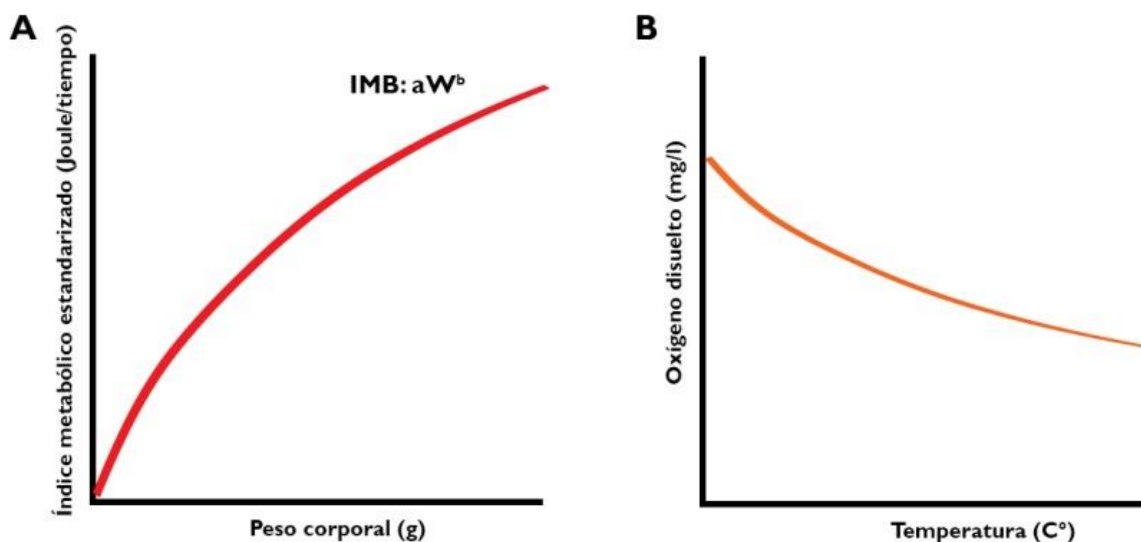


Figura 7. El índice metabólico de los animales en función de su peso corporal y efecto de la temperatura sobre la solubilidad del oxígeno en el agua.

A. Curva teórica que muestra la relación alométrica entre el índice metabólico estándar y el peso de un animal. La curva responde a la ecuación $IMB=aW^b$; donde IMB: índice de masa corporal; W. peso del animal, y a-b son constantes. **B.** Curva teórica que muestra la relación inversa entre la concentración de oxígeno en el agua y la temperatura del agua. El valor de concentración del gas corresponde al valor de saturación para cada temperatura.

Estos efectos de la temperatura sobre el metabolismo y la solubilidad de los gases tienen una enorme importancia en el mantenimiento de la homeostasis, particularmente en animales acuáticos que viven en los trópicos, o que viven en regiones templadas con veranos calurosos. Los animales acuáticos tienen además otro problema a resolver y que se origina por la elevada conductividad térmica y capacidad calórica del agua respecto al aire. Los animales acuáticos pequeños tienden a perder calor más rápidamente que los grandes, y necesitan en consecuencia un **mayor consumo por gramo de tejido**, oxígeno que está menos disponible en solución. Es entonces que los animales acuáticos pequeños tenderán a aumentar la superficie de intercambio de gases (superficie branquial, por ejemplo) en situaciones de stress térmico crónico, o aumentando el ritmo respiratorio y cardíaco en situaciones agudas.

Los **peces** son el grupo de vertebrados más exitoso, con una riqueza específica estimada en unas 32.500 especies (Nelson, 2006). Esta diversidad se ve reflejada también en las diversas estrategias fisiológicas que han desarrollado a través del camino evolutivo para resolver algunos desafíos ambientales, como ser la antinomia “índice metabólico-oxígeno disuelto”. Dentro de los peces óseos (Osteichthyes) uno de los órdenes más diversos es el de los Siluriformes (“Bagres” o “Peces gato”), que cuenta con unas 2800 especies descritas. La riqueza específica de los Siluriformes corresponde a casi el 40% de las especies de peces de agua dulce registradas en Argentina (Koerber, Litz, & Mirande, 2015). Los bagres son conocidos peces que han desarrollado la capacidad de respirar aire atmosférico de forma independiente en varios clados, y la respiración dual suele activarse cuando la concentración de oxígeno en el agua es baja (Nelson, 2014). Ésta respiración de aire puede cuantificarse por el número de veces que el animal tiene que ir a la superficie a respirar (teniendo presente que la mayoría de los bagres habitantes del bentos de los cuerpos de agua). Nosotros trabajaremos con ejemplares de *Corydoras paleatus* (Callichthyidae) una pequeña especie de bagre acorazado de origen parano-platense, muy conocida en el *hobbie* acuarístico. La especie ha sido **trasplantada** fuera de su área original, desarrollando poblaciones estables hacia el sur y el oeste de la Argentina (incluyendo algunos cuerpos de agua de Mendoza), lo que nos da una idea de su rusticidad, resistencia tanto al frío como al calor y disponibilidad de individuos; características que lo hace apto para el presente estudio.



Figura 8. La especie animal elegida para el experimento II: el pez limpiafondos.

Corydoras paleatus (Jenyns, 1842) (Callichthyidae, Osteichthyes), un pequeño pez gato acorazado nativo del país, en el acuario (Fotografía, Federico Dell'agnola).

Objetivos

1. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la frecuencia respiratoria de un animal acuático con respiración dual, *Corydoras paleatus*.
2. Analizar el efecto de la temperatura y el consumo de oxígeno en función del tamaño corporal.

Material

Material de laboratorio

- Tres peceras de vidrio con su correspondiente termómetro.
- Un calefactor con termostato.
- Aireador y piedra difusora, con sus correspondientes reguladores.
- Bolsas refrigerantes.
- Agua destilada.
- NaCl
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 10%
- PHímetro.
- Test de oxígeno

Material biológico

- 6 ejemplares pequeños de *Corydoras paleatus*, ayunadas desde el día anterior.
- 6 ejemplares grandes de *Corydoras paleatus* ayunadas desde el día anterior.

Metodología

1. Dividir a los peces en los tres acuarios, procurando ubicar dos ejemplares pequeños y dos ejemplares grandes por acuario.

2. Llenar las peceras con 9 partes de agua reconstituida con cloruro de sodio (5 g/10 l) y 1 parte de agua corriente declorada con tiosulfato de sodio (1 gota por litro de agua, que da una concentración aproximada de 4 mg/L). Esa concentración salina proporciona una conductividad similar al agua de la cabecera del sistema de distribución de agua del Río Mendoza (900 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Morábito et al., 2014) pero disminuye la capacidad amortiguadora de pH del agua por ausencia de sales carbonatadas. Conectar luego aireación suave.
3. En el primer acuario, ubicar a los peces. Dejar descansar a los animales por unos 10 minutos y proceder de la siguiente manera. Desconectando la aireación, contar los movimientos operculares durante treinta segundos, cada 5 minutos aproximadamente. Repetir hasta alcanzar un ritmo ventilatorio similar en las últimas tres mediciones, o al finalizar sesenta minutos totales experimentales desde el primer conteo. Durante ese período de tiempo, contar el llenado intestinal de los ejemplares de igual tamaño.
4. En el segundo acuario, ubicar a los peces y bajar lentamente la temperatura con hielo a 10 °C. Una vez alcanzado este punto, esperar 10 minutos. Luego, desconectar la aireación y contar los movimientos operculares durante treinta segundos, cada 5 minutos aproximadamente. Repetir hasta alcanzar un ritmo ventilatorio similar en las últimas tres mediciones, o al finalizar sesenta minutos totales experimentales desde el primer conteo. Durante ese período de tiempo, contar el llenado intestinal de los ejemplares de igual tamaño.
5. En el tercer acuario, proceder como en el punto cuatro pero llevar la temperatura lentamente a unos 35 °C.
6. Al comienzo y al final del experimento, medir el pH del agua. Proceder de la misma forma con el test de oxígeno.

Análisis de resultados

1. Graficar ritmo respiratorio (en una unidad apropiada) vs el tiempo.

2. En función de los objetivos, analizar por separado los tratamientos térmicos y los diferentes tamaños corporales. Identificar forma y pendientes de las curvas.
3. Elaborar un informe que sintetice los resultados obtenidos. Discuta y concluya sobre los mismos, tomando en cuenta las preguntas e interrogantes posteriores.
4. ¿Qué efecto tiene la temperatura sobre el metabolismo? ¿y las necesidades de oxígeno en organismos aeróbicos?
5. Teniendo en cuenta lo aprendido en la materia ¿Es esperable encontrar diferencias significativas según el tamaño corporal? ¿Cómo serían esas diferencias teóricas? ¿Se observó en el trabajo práctico?

TRABAJO DE LABORATORIO V. CAMBIOS ANATÓMICOS EN RESPUESTA A DESAFÍOS FISIOLÓGICOS

Breve marco teórico

La fisiología y la anatomía son disciplinas íntimamente relacionadas. Muchos cambios fisiológicos se traducen en cambios morfológicos si el estímulo ambiental ocurre durante un tiempo prolongado (que depende de la especie y del estímulo) o **crónico**. Los mediadores entre el estímulo ambiental y la respuesta morfológica final son típicamente respuestas **nerviosas, inmunológicas**, y especialmente **hormonales**. Si bien los desafíos ambientales pueden ser muy diversos, uno de los más importantes que enfrentan los animales acuáticos es la regulación salina de los líquidos del plasma. Como ya hemos visto, los iones juegan un rol clave en el mantenimiento de los potenciales de membrana, en la regulación osmótica, y en el contenido de agua del organismo. En el líquido extracelular, ciertos iones tienden a ser abundantes (Na^+ , Cl^-) mientras que otros son escasos (K^+ por ejemplo). Otros iones tienen una norma fisiológica plasmática con un rango sumamente estrecho (por ejemplo, Ca^{+2}) ya que participan en procesos fisiológicos vitales como señalización intracelular, la regulación de los potenciales de membrana, la contracción muscular, entre otros.

La fisiología clásica, basada fundamentalmente en la regulación hidrosalina de los mamíferos, describe al **riñón** como principal órgano de excreción y balance electrolítico del medio interno. Sin embargo, los Osteichthyes (o “peces óseos”) el grupo que engloba a más de la mitad de las especies de cordados (Froese & Pauly, 2015), utiliza principalmente las branquias como órgano regulador del balance hidrosalino. Los peces óseos son hiposmóticos cuando viven en el mar (los fluidos extracelulares del pez están menos concentrados que el agua de mar), pero son hiperosmóticos en agua dulce (es decir, el plasma está más concentrado que el agua). La solución fisiológica que adoptaron estos animales en agua dulce es interesante; producen grandes cantidades de orina diluida, de modo de compensar la ganancia natural de agua por osmosis. Al mismo tiempo, poseen una gran capacidad para incorporar sales del medio a través de las branquias, que de otra forma se perderían siguiendo su gradiente de concentración. Por el contrario, en agua salada, los peces óseos tienden a deshidratarse, ya que el agua tiende a seguir el gradiente osmótico. El animal compensa esta situación bebiendo grandes cantidades de agua de mar. Sin embargo, esta solución fisiológica acarrea un nuevo problema: la incorporación de grandes cantidades de iones al plasma (El agua marina es una solución compleja de iones con una salinidad promedio de 3,5% p/v, de la cual $\frac{3}{4}$ partes corresponde a sal de mesa, NaCl). Los Osteichthyes

marinos tienen entonces una gran capacidad de excretar activamente sales hacia el medio externo, función compartida entre las **branquias** (que excretan la mayoría de los **iones monovalentes**) y el **riñón** (que excreta los **iones divalentes**). Las branquias por consecuencia no son simples órganos especializados en el intercambio gaseoso, sino que juegan un rol fundamental en el intercambio iónico. Desde un punto de vista histológico, tres tipos celulares pueden reconocerse en el tejido branquial típico: **células pavimentosas** (especializadas fundamentalmente en el intercambio gaseoso) **células accesorias o mucosas** (que producen una mucosidad que actúa como protección mecánica e inmunitaria) y **células de cloruro**, que son las células especializadas en la regulación iónica branquial (Genten, Terwinghe, & Danguy, 2009). Las células de cloruro son extremadamente versátiles, y responden al estrés ambiental por medio de mensajeros hormonales (glucagón, leucotrienos, cortisona, etc.) y neurotransmisores (acetilcolina, adrenalina) (Baldiasserotto, Mancera Romero, & Kapoor, 2007; Wood & Shuttleworth, 1995). En agua marina, estas células branquiales son capaces de disminuir activamente la concentración de cloruro de sodio sérico (**Figura 6 A**) mientras que en agua dulce son capaces de transportar activamente cloruro de sodio desde el agua, en un transporte acoplado con la excreción de protones y amoníaco (**Figura 6 B**).

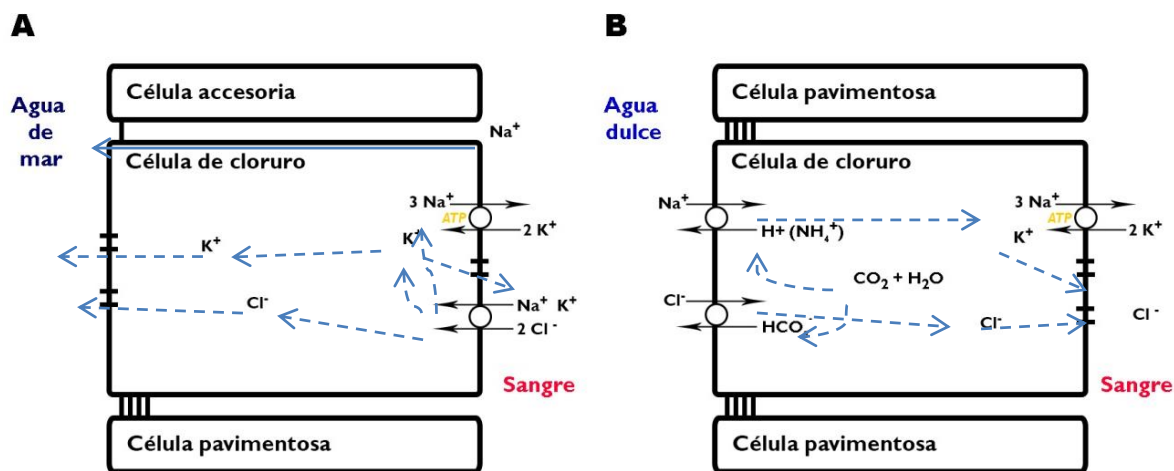


Figura 9. Mecanismos moleculares observados en las células de cloruro de peces teleosteos.

A. Situación fisiológica de las células de cloruro en un teleosteo en agua de mar. **B.** Situación fisiológica de las células de cloruro de un teleosteo en agua dulce. El transporte activo y cotransporte está representado por líneas continuas, mientras que la difusión pasiva está representada por líneas azules discontinuas. La línea azul continua, corresponde a la difusión paracelular de sodio. Las uniones intracelulares estrechas están representadas por cuatro líneas negras, mientras que las uniones celulares laxas están representadas por una sola línea negra. Adaptado de *Fish Physiology*, Vol. 14 (Wood & Shuttleworth, 1995).

Las células de cloruro cumplen en agua dulce otra función extremadamente importante. Son las encargadas de transportar activamente el ión Ca^{+2} hacia el plasma desde el agua. Esto es especialmente importante en los peces que viven en aguas “blandas”, que por definición son aguas pobres en iones divalentes y salinidad general. Es notable la proliferación que puede verse de estas células branquiales, en peces que viven en aguas pobres en Ca^{+2} , aún a costa de reducir proporcionalmente el número de células pavimentosas, y por tanto, la membrana respiratoria (Hill et al., 2006).

En general, los peces óseos viven o en el mar o en agua dulce, pero existe un número relativamente importante de especies que pueden vivir y aclimatarse a aguas de salinidad fluctuante en relativamente cortos períodos de tiempo. Uno de estos animales es *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842), comúnmente conocida como la “madrecita de agua”. Este es un pequeño pez vivíparo, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza, incluidos cuerpos de agua urbanos; **Figura 7**) gracias a su gran capacidad de resistir bajas temperaturas invernales y aguas de concentración salina elevada o mínima. La Madrecita de Agua es común de encontrar también en cuencas endorreicas de salinidad elevada, como ser la laguna mar Chiquita (Córdoba) o la Laguna de Llanquanelo (Mendoza). Incluso puede habitar estuarios y desembocaduras de arroyos a escasa distancia del mar, o la misma zona costera marina en raras ocasiones. La especie posee entonces una gran capacidad de amortiguar los cambios de salinidad del medio, ajustando su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h (Rosso, 2006). *Jenynsia* está incluida en la familia **Anablepidae** (Garman, 1895), un pequeño taxón de peces ciprinodontiformes de origen marino, vivíparos y con un notable dimorfismo sexual; que pueden encontrarse actualmente en aguas dulces, salobres e incluso marinas (Froese & Pauly, 2015).



Figura 10. La especie animal elegida para el experimento IV: la madrecita de agua. *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Osteichthyes), ejemplar provenientes del arroyo Carrizal, cuenca del Río Tunuyán, Mendoza. (Fotografía, Federico Dell agnola).

Objetivos

El objetivo general es evaluar los cambios histológicos en la branquia de ejemplares del vertebrado *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) cuando el pez ha sido aclimatado (21 días) en agua dulce “dura” (> 300 ppm de CaCO_3) o en agua blanda (~ 60 ppm CaCO_3). Adicionalmente, analizaremos de qué forma este organismo puede censar el medio y procesar una respuesta fisiológica al desafío ambiental planteado.

Material

Material de laboratorio

- Microscopio óptico convencional con cámara incorporada.
- Software de análisis de micrografías (Image ProPlus Versión 6).
- Software de análisis estadístico.

Material biológico

- Cortes histológicos de branquias del teleósteo *Jenynsia multidentata*, tomados bajo diferentes condiciones ambientales (agua “dura”, agua “blanda”).

Metodología

1. Tomar al menos 10 micrografías (a 60X) de laminillas branquiales de *J. multidentata*, desde cortes histológicos de animales sometidos a las condiciones ambientales experimentales. Las micrografías tienen que provenir de láminas branquiales tomados al azar, pero que se encuentren en buenas condiciones de conservación.
2. Identificar histológicamente los tipos celulares de las branquias con ayuda de atlas histológicos (Genten et al., 2009; Mumford et al., 2007). La **Figura 8** puede tomarse como guía histológica para la identificación de los tipos celulares de *J. multidentata*:

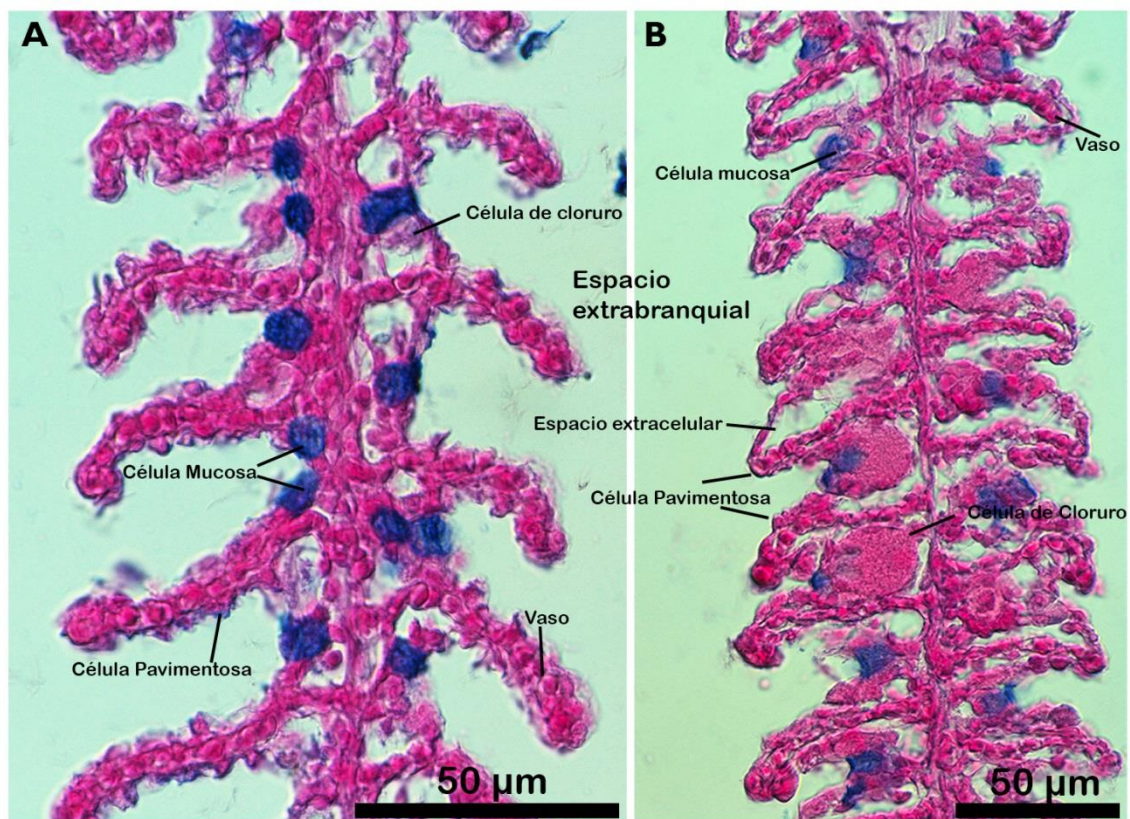


Figura 11. Histología de las laminillas branquiales de la madrecita de agua.

A. Laminillas branquiales de un ejemplar de *Jenynsia multidentata* aclimatado a agua dulce dura (> 300 ppm de CaCO_3). **B.** Laminillas branquiales de un ejemplar de *Jenynsia multidentata* aclimatado a agua dulce blanda (~ 60 ppm de CaCO_3). El tejido branquial está teñido con tinción tricrómica (Alcian blue 8G-Nuclear Fast Red-eosina) (Micrografía A y B: Federico Dell agnola).

3. Con el programa Image ProPlus Versión 6 (Media Cybernetic, 2012), medir las áreas ocupadas por células de cloruro y espacios extracelulares de la siguiente manera:

Abrir la foto a trabajar desde el archivo de fotos. Abrir el menú “Measure”, luego “Count/Size” y “Options”. Asegurarse el siguiente seteo:

- a. “Outline style”: Fillet
- b. “Label Style”: None
- c. “Dark Background on Sample”: destildada.
- d. “Objet options”: 4-connect
- e. “Smoothing”: 0
- f. Resto de opciones destildadas.
- g. “Clean Borders”: None
- h. Apretar “OK” al final. Cerrar la ventana.

Entrar a “Manual Measurements”. El ícono es un compás con una regla amarilla. Dentro de la misma ventana, seleccionar entre las figuras geométricas el Rectángulo. Seleccionar en “Measurements”: Área. Seleccionar toda la fotografía. Seleccionar “Features” y asegurarse que exista una medición “R1” con su correspondiente valor de área en píxeles. Seleccionar posteriormente “Input/Output”, tildar “Features” y “Clipboard”. Al final pinchar “Export Now” y copiar en un archivo Excel.

Posteriormente, seleccionar entre las figuras geométricas el polígono central. Apretar y mantener el botón izquierdo del mouse y dibujar manualmente el borde de las áreas ocupadas por las células de cloruro. Repetir hasta dibujar cada una de las células de cloruro de la micrografía, y también los espacios internos en el tejido. Una vez completado, seleccionar “Measurements” y asegurarse que exista una medición “Cx_i hasta Cx_n” con su correspondiente valor de área en píxeles. Seleccionar posteriormente “Input/Output”, tildar “Features” y “Clipboard”. Al final pinchar “Export Now” y copiar en el archivo Excel. De la misma forma, y como mediciones independientes, medir los espacios linfáticos entre las células pavimentosas y capilares branquiales.

Por último, seleccionar nuevamente entre las figuras geométricas el polígono central. Apretar y mantener el botón izquierdo del mouse y dibujar manualmente el borde de las áreas de la lámina branquial, de modo de obtener una estimación del espacio “extrabranquial”. Completar cuidadosamente hasta casi cerrar el trazo pero sin llegar al punto de partida. Soltar botón izquierdo y apretar el botón derecho del mouse. Automáticamente se cierra el trazo. Completar todos los espacios extrabranquiales posibles. Una vez terminado, seleccionar “Measurements” y asegurarse que exista una medición “PGx_i hasta PGx_n” con su correspondiente valor de área en píxeles. Seleccionar posteriormente “Input/Output”, tildar “Features” y “Clipboard”. Al final seleccionar “Export Now” y copiar en el archivo Excel.

En una planilla de Excel, calcular el porcentaje de ocupación de las células de cloruro como la sumatoria de todas las células de cloruro relativo al área branquial total. De la misma forma proceder con los espacios extracelulares. El área branquial total es el área total de la fotografía menos las áreas poligonales extrabranquiales. Expresar como porcentaje o como medida cuadrática, utilizando las herramientas de regla de Image – Pro Plus. 6.0.

También anotar el número entero de células de cloruro por micrografía.

Análisis de resultados

1. Analizar estadísticamente el número de células de cloruro por campo para cada tratamiento, como así el porcentaje de ocupación de este tipo celular por superficie branquial respectivamente. Indicar, si hay diferencias de la media obtenida, qué efecto tiene la salinidad del agua sobre las células branquiales. Expresar los resultados en forma gráfica, identificando claramente las variables.
2. Elaborar una presentación oral que resuma breve y concisamente los resultados obtenidos. Discuta y concluya sobre los mismos, tomando en cuenta las siguientes preguntas e interrogantes:

3. En caso de detectar diferencias significativas, ¿Qué es lo que censa y provoca el cambio en el número y masa de las células de cloruro branquiales? Considere la mayoría de factores hormonales y nerviosos que podrían estar involucrados en el cambio morfológico observado.
4. ¿Qué ventajas ecológicas puede tener para un pez este tipo de mecanismos fisiológicos?
5. ¿Cuál es la diferencia entre este tipo de *aclimatación* fisiológica y *adaptación* de la especie al medio?

BIBLIOGRAFÍA

- Anger, K. (2013). Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, 33(2), 151-183.
- Arillo, A., Margiocco, C., Melodia, F., Mensi, P., & Schenone, G. (1981). Ammonia toxicity mechanism in fish: studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 5(3), 316-328.
- Baldisserotto, B., Mancera Romero, J. M., & Kapoor, B. G. (2007). *Fish Osmoregulation*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers.
- Brusca, R., & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates* (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Camargo, J., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849.
- Carreño, C. A., & Nishikawa, K. C. (2010). Aquatic feeding in pipid frogs: the use of suction for prey capture. *The Journal of experimental biology*, 213(12), 2001-2008.
- Collins, P. A., & Paggi, J. C. (1997). Feeding ecology of *Macrobrachium borelli* (Nobili) (Decapoda: Palaemonidae) in the flood valley of the River Paraná, Argentina. *Hydrobiologia*, 362(1-3), 21-30.
- Dellagnola, F. (2015). *Estudio comparativo de los corpúsculos pigmentarios de la glándula digestiva de tres especies de ampuláridos*. (PhD Thesis), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- EPA. (2013). *Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia—freshwater 2013*. Washington, DC.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Francis-Floyd, R., Watson, C., Petty, D., & Pouder, D. B. (2010). Ammonia in aquatic systems. *Fisheries and Aquatic Sciences*, P4. Retrieved from Florida Cooperative Extension Service website: <http://edis.ifas.ufl.edu/FA031>
- Froese, R., & Pauly, D. (2015). FishBase. from www.fishbase.org
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). *Atlas of Fish Histology*: Science Publishers.
- Hayes, K., Joshi, R., Thiengo, S., & Cowie, R. (2008). Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions*, 14(4), 701-712.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., & Larson, A. (2003). *Animal Diversity* (3rd ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2006). *Fisiología Animal*: Ed. Médica Panamericana.
- Hillman, S. S. (2009). *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. New York: Oxford University Press.
- Joshi, R. C., & Sebastian, L. S. (2006). *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*: Philippine Rice Research Institute Nueva Ecija.
- Koerber, S., Litz, T., & Mirande, J. M. (2015). CLOFFAR - update 1 - supplement to Checklist of the Freshwater Fishes of Argentina. *Ichthyological Contributions of PecesCriollos*, 39, 1-4.
- Lang, T., Peters, G., Hoffmann, R., & Meyer, E. (1987). Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Diseases of aquatic organisms*(3), 159-165.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). *100 of the World's Worst Invasive Alien Species: a selection from the Global Invasive Species Database*. Auckland, New Zealand: Species Survival Commission; IUCN.

- Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., . . . Thirion, J.-M. (2012). Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions*, 14(11), 2255-2270.
- Morábito, J., Lavie, E., Salatino, S., Bermejillo, A., Filippini, M., Campos, S., . . . Mastrantonio, L. (2014). Calidad del agua de riego de los ríos Mendoza y Tunuyán superior. Tendencias y recomendaciones. <https://www.ina.gov.ar/ifrh-2014/Eje2/2.18.pdf>
- Morrone, J. J., & Lopretto, E. C. (1995). Parsimony analysis of endemism of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) from southern South America. *Neotropica*, 41, 3-8.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B., & Blazer, V. (2007). *Fish Histology and Histopathology*: US Fish & Wildlife Service-National Conservation Training Center (USFWS-NCTC).
- Nelson, J. (2006). *Fishes of the World* (4th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Nelson, J. (2014). Breaking wind to survive: fishes that breathe air with their gut. *Journal of fish biology*, 84(3), 554-576.
- Randall, D., Burggren, W. W., French, K., & Eckert, R. (2002). *Eckert - Animal Physiology*: Macmillan.
- Rawlings, T. A., Hayes, K. A., Cowie, R. H., & Collins, T. M. (2007). The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 97.
- Rosso, J. J. (2006). *Peces Pampeanos: Guía y Ecología*. Buenos Aires: L.O.L.A.
- Russo, R. C. (1985). Ammonia, nitrite, and nitrate. In G. M. Rand & S. R. Petrocelli (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications* (pp. 455-471): FMC Corp., Princeton, NJ.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environment* (5th ed.): Cambridge University Press.
- Tomasso, J. R., Goudie, C., Simco, B., & Davis, K. (1980). Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 109(2), 229-234.
- Vega, I. A., Giraud-Billoud, M., Koch, E., Gamarra-Luques, C., & Castro-Vazquez, A. J. (2007). Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Veliger*, 48(4), 276-283.
- Wood, C. M., & Shuttleworth, T. J. (1995). *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation* (Vol. 14). San Diego, CA: Academic Press.
- Wright, P. A. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *The Journal of experimental biology*, 198(2), 273-281.